

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

DIE LOKALISATION VON INTRAVASAL ZUGEFÜHRTEM
NATIVEM PROTEIN-ANTIGEN IN IMMUNKOMPETENTEM
GEWEBE
UNTERSUCHUNGEN AN GAUMENMANDEL, HALSLYMPH-
KNOTEN UND MILZ DES KANINCHENS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Otto Wilhelm Sauer
aus Mainz

1969

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin

Direktor : Herr Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

"Die Lokalisation von intravasal
zugeführtem nativem Protein-
Antigen in immunkompetentem
Gewebe.

Untersuchungen an Gaumenmandel,
Halslymphknoten und Milz des
Kaninchens".

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sauer, Horst Otto Wilhelm
aus Mainz.

Dekan : Herr Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

Referent : Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

Korreferent : Professor Dr. med. Werner Schwab



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am : 4.9.1969

DIE LOKALISATION VON INTRAVASAL
ZUGEFÜHRTEM NATIVEM PROTEIN -
ANTIGEN IN IMMUNKOMPETENTEM
GEWEBE.

UNTERSUCHUNGEN AN GAUMENMANDEL,
HALSLYMPHKNOTEN UND MILZ DES
KANINCHENS.

I. Einleitung	3
Aufgabenstellung	5
II. Durchführung der Versuche	6
A. Material	6
B. Methoden	6
a. Applikationsformen	6
b. Versuchsdauer	7
c. Histochemische Methode	7
III. Ergebnisse	14
A. Gaumenmandel	14
1. Intraarterielles Angebot von MPOD	14
2. Intravenöses Angebot von MPOD	16
Besprechung der Ergebnisse	18
B. Halslymphknoten	20
1. Intraarterielles Angebot von MPOD	20
2. Intravenöses Angebot von MPOD	21
Besprechung der Ergebnisse	22
C. Milz	23
1. Intraarterielles Angebot von MPOD	23
2. Intravenöses Angebot von MPOD	24
Besprechung der Ergebnisse	24
IV. Zusammenfassung	26
V. Literaturverzeichnis	28
VI. Bildteil	31

I. EINLEITUNG

Die Speicherung und Lokalisation eines Antigens im lymphatischen Gewebe ist für die Klärung des Mechanismus der Immunantwort von zentraler Bedeutung. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf die zelluläre Lokalisation eines injizierten Antigens im lymphatischen Gewebe (14).

Es konnte gezeigt werden, daß Protein- und Polysaccharid-Antigen in den phagozytierenden Zellen des lymphatischen Gewebes lokalisiert, und daß es in den Primärknötchen der Lymphknoten konzentriert ist (14). Nichtantigenes Material soll in der Regel nicht in den Follikeln lokalisiert sein, stark antigene Substanzen, wie Bakteriengeißeln-Antigen, zeigen stets follikuläre Lokalisation. Dagegen sollen schwache Antigene, wie Humanserum Albumin, eine geringere Neigung zu follikulärer Lokalisation haben (14).

Im Lymphknoten sollen zwei Systeme von Makrophagen für die Aufnahme und Speicherung von Antigenen verantwortlich sein. Es handelt sich dabei um die Makrophagen in den Primär- und Sekundärknötchen und um die Makrophagen im Bereich der Intermediärsinus. In den Intermediärsinus soll das Antigen intrazellulär in den Makrophagen lokalisiert sein, während es in Primär- und Sekundärknötchen an der Membran der äußersten Zellfortsätze nicht näher definierter Zellen angelagert zu werden scheint (8). Diese Befunde (8) sind mit J^{125} markierten Bakteriengeißeln-Antigen erhoben worden. Es ergibt sich die Frage, in welchem Ausmaß diese Methode-Verabreichung eines mit J^{125} markierten Antigens und autoradiographischer Nachweis des Radionuclids - beweiskräftig ist. Da man eigentlich nur das Radionuclid nachweist, geht man von der Voraussetzung aus, daß ein zur Markierung verwendetes Nuclid nicht von der zu

markierenden Substanz gänzlich oder teilweise abgespalten wird, und daß das Nuclid die determinierenden Gruppen des Antigens markiert. Keine dieser Voraussetzungen ist jedoch ohne weiteres erfüllt. Die mit dieser Methode durchgeführten Untersuchungen sind daher mit größter Vorsicht zu beurteilen.

Da diese Befunde zur Klärung der Frage beitragen könnten, ob Makrophagen direkt, indirekt oder überhaupt nicht mit dem Mechanismus der Antikörperbildung in Zusammenhang stehen, ist die Überprüfung mit einer adäquateren Methode angebracht. Als Makrophagen werden unregelmäßig geformte Zellen des lymphoretikulären Gewebes bezeichnet, die Phagozytose- und Speicherungsbereitschaft zeigen. Eine Spezialform dieser Zellen sind Blutgefäßendothelien (1, 3).

Meerrettich-Peroxydase (MPOD)^{x)}, ein Chromoprotein mit dem Molekulargewicht von 44000 (24), ist für Kaninchen (7, 23) und Hühner (5, 16) immunogen. Nach intravenöser Injektion wurde dieses Enzymprotein histochemisch und zytochemisch in Milz, Niere, Dünndarm, Lunge, Prostata und Thymus nachgewiesen (17, 18, 19, 21). Bei Verwendung dieses Enzymproteins (MPOD) als Beispiel für die Lokalisation eines Antigens in einem lymphatischen Organ, hätte man den Vorteil, spezifisch das Schicksal des intakten oder zumindest soweit intakten Moleküls, welches seine biologische Aktivität, nämlich seine Enzymaktivität, noch nicht eingebüßt hat, zu verfolgen. Dies bedeutet allerdings auch eine Limitierung der Methode, da das Antigen nur während einer relativ kurzen Zeitspanne, 1 - 3 Tage nach seiner Verabreichung, verfolgt werden kann. Da das Antigen durch seine Enzymaktivität sichtbar gemacht wird, ist andererseits mit einer hohen Empfindlichkeit des Nachweises zu rechnen.

^{x)}Anmerkung:

Meerrettich-Peroxydase (MPOD) wird als exogene Peroxydase, Granulozyten-Peroxydase (POD) wird als endogene Peroxydase bezeichnet.

AUFGABENSTELLUNG

Es sollte versucht werden, dieses Antigen (MPOD), nach Einbringen in die Blutbahn, in Gaumenmandel- und Lymphknotengewebe zu lokalisieren. Diese Ergebnisse sollten mit von Straus (21) an Rattenmilz Beschriebenem verglichen werden.

Ein besonderes Augenmerk sollte, soweit dies lichtoptisch möglich ist, darauf gerichtet werden, ob dieses Antigen ausschließlich intrazellulär oder auch, wie Mitchell und Abbot (8) und Nossal (13) bei J^{125} markierten Antigen beschrieben haben, an der äußeren Membran der Fortsätze der Retikulumzellen anzutreffen ist. In Bezug auf die intrazelluläre Lokalisation sollte versucht werden, zu differenzieren, in wie weit dieses in Phagosomen oder Phagolysosomen der betreffenden Zellen vorliegt. Saure-Phosphatase gilt als lysomales Leitenzym. Durch den kombinierten zytochemischen Nachweis der sauren-Phosphatase und der Meerrettich-Peroxydase sollten Meerrettich-Peroxydase haltige Phagolysosomen und saure-Phosphatase und Meerrettich-Peroxydase haltige Phagolysosomen nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten gleichzeitig als Voruntersuchungen für anschliessende elektronenoptische Arbeiten dienen.

II. DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

A. MATERIAL

a. Als Versuchstiere wurden zwölf 2-3 kg schwere Neuseeländer Kaninchen verwendet. Diese Tiere wurden auf folgende Versuchsgruppen verteilt :

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| 1. Intraarterielles Angebot | : 4 Versuchstiere |
| 2. Intravenöses Angebot | : 4 Versuchstiere |
| 3. Kontrolle | : 4 Versuchstiere |

b. Es wurde Meerrettich-Peroxydase (MPOD) vom Reinheitsgrad 2 als Lyophilisat der Firma C. F. Boehringer & Soehne Mannheim verwendet.

B. METHODEN

a. APPLIKATIONSFORMEN

1. Intraarterielles Angebot

Bei der intraarteriellen Applikation wurden jeweils 150 mg MPOD, gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung, in die A. carotis communis des narkotisierten Tieres injiziert. Die Nembutal (R) - Narkose wurde während der gesamten Versuchsdauer aufrecht erhalten. Nach Entfernen der Kanüle wurde die verletzte Stelle der Arterie mit einer kleinen gebogenen Gefäßklemme tangential verschlossen, um eine weitere Durchgängigkeit der Arterie zu gewährleisten.

2. Intravenöses Angebot

Bei der intravenösen Applikation wurden 150 mg MPOD, gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung, in eine marginale Ohrvene injiziert.

3. Kontrolle

Im Kontrollversuch erhielten die Tiere in der entsprechenden Applikationsform (i.a. und i.v.) jeweils 2 ml physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

b. VERSUCHSDAUER

Wie Serum-Clearance Untersuchungen gezeigt haben (5) ist 3 Stunden nach der i.a- oder i.v.-Verabreichung von MPOD fast das gesamte Enzymprotein aus der Blutbahn eliminiert (MPOD - Aktivität im Serum unter 0,1 % des maximalen Blutserumspiegels).

Aus diesem Grunde sind die mit der MPOD injizierten Tiere 3 Stunden nach Verabreichung dieses Enzymproteins durch Überdosierung von Nembutal ^(R) getötet worden.

Anschliessend sind beide Gaumenmandeln (6), zwei Halslymphknoten und die Milz entnommen worden.

c. HISTOCHEMISCHE METHODE

1. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Gewebestücke sind nach der von Straus (17,20) angegebenen Methode wie folgt behandelt worden:

Die 0,2 bis 0,4 g schweren Blöcke sind jeweils in 100 ml Fixationslösung gebracht worden.

Fixationslösung : 30 g Saccharose ad 100 ml mit 10 %iger Formalinlösung.

Die Präparate wurden in dieser Lösung zunächst für 1 Stunde, nach Erneuerung der Lösung für weitere 17 Stunden bei 0-4°C in dieser belassen.

Anschliessend wurden die Präparate in einer 30 %igen wässrigen Saccharoselösung (0-4°C) für weitere 24 Stunden aufbewahrt.

Die Blöcke wurden dann mit Kohlensäure aufgefroren und etwa 10 µ dicke Krysostatschnitte angefertigt.

Die verwendeten Objektträger wurden mit Eiweiß-Glycerin vorbehandelt, um ein besseres Haften der Schnitte in den Inkubationslösungen zu erzielen.

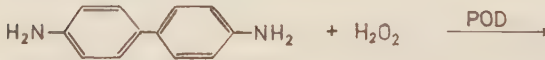
Die Schnitte wurden 30 min bei Zimmertemperatur angetrocknet.

2. Nachweis von exogener- und endogener POD nach Straus (17) :

Prinzip :

Peroxydase katalysiert die Oxydation eines Substrates durch Wasserstoffperoxyd. Als Substrat dient Benzidin. Benzidin wird zu Diphenol-chinon-diimin oxydiert.

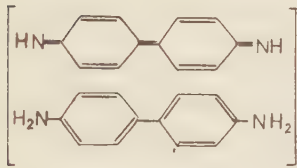
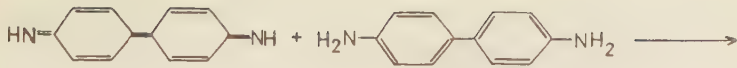
Ein Diphenol-chinon-diimin lagert sich mit einem Benzidin-Molekül zu dem unlöslichen Benzidinblau zusammen (15).



Benzidin



Diphenol-chinon-diimin



Benzidinblau

An den enzymaktiven Stellen des Präparates entsteht eine blaue Färbung.

Da auch die Granulozyten POD-Aktivität enthalten (endogene POD), muß eine zusätzliche Differenzierung erfolgen.

Durchführung des Peroxydase-Nachweises:

Alle Reaktionen wurden bei 0-4°C durchgeführt.

Die Präparate werden für 60 sec in einer Lösung von :

40 mg Benzidin
1 ml 3%iges Wasserstoffperoxyd
ad 100 ml mit 70%igen Äthylalkohol

inkubiert.

Zur Stabilisierung des blauen Reaktionsproduktes wurden die Präparate, nachdem die Benzidinlösung gut abgetropft ist, in eine Nitroprussidnatriumlösung I gebracht (20).

Diese Lösung setzt sich zusammen aus :

20 ml aqua dest.
9 g Nitroprussidnatrium
70 ml 96 %iger Äthylalkohol
ad 100 ml mit aqua dest.

In dieser Lösung I werden die Präparate unter leichter Bewegung 60 sec belassen und anschliessend für eine Stunde zur weiteren Stabilisierung des Reaktionsproduktes in eine mit Acetat-Puffer gepufferte Nitroprussidnatriumlösung II gebracht.

Diese Lösung setzt sich zusammen aus :

20 ml aqua dest.
9 g Nitroprussidnatrium
5 ml Acetat-Puffer pH 5 (0,2 m)
ad 100 ml mit aqua dest.

Nach Abkühlen auf 0-4°C wird die Lösung vor Gebrauch filtriert.

Die Präparate werden, nachdem sie durch eine Alkoholreihe entwässert wurden, mit Eukitt eingedeckt.

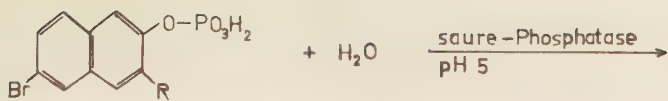
3. Nachweis der saure-Phosphatase-Aktivität nach der Methode von Barka und Anderson (2) :

Prinzip :

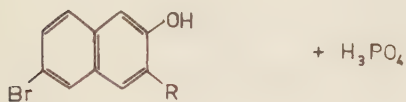
Das Enzym saure-Phosphatase katalysiert die Spaltung von Phosphorsäureestern bei sauren pH-Werten.

Als Substrat dient der Phosphorsäureester von Naphtol-AS-BI (6 Brom-2 phosphohydroxy-3 naphtoesäure-o-anisidid).

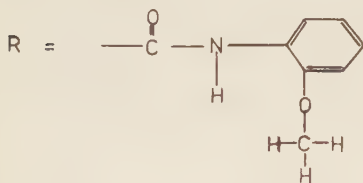
Das an enzymaktiven Stellen freigesetzte Naphtol-AS-BI wird mit hexazotiertem Pararosanilin zu einem unlöslichen roten Azofarbstoff umgesetzt.



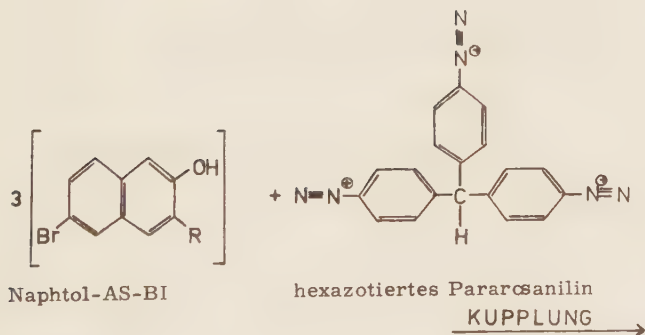
Naphtol-AS-BI-Phosphat



Naphtol-AS-BI



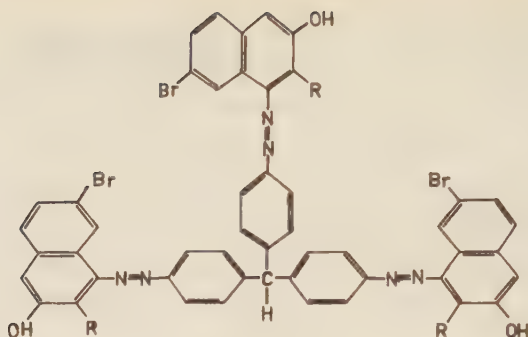
Und :



Naphtol-AS-BI

hexazotiertes Pararosanilin

KUPPLUNG



Azofarbstoff (rot)

Durchführung des saure-Phosphatase Nachweises:

Die Kryostatschnitte wurden in einer Lösung folgender Zusammensetzung inkubiert:

- 3 ml Naphtol-AS-BI-Phosphat (10 mg/ml Dimethylformamid)
- 15 ml Veronal-Puffer nach Michaelis, p^H 5,0
- 2,4 ml $NaNO_2$ (4 %ige wässrige Lösung)
- 2,4 ml Pararosanilin (4 %ige wässrige Lösung)
- ad 60 ml mit aqua dest.

Die Präparate werden bei 0-4°C für 30 min in dieser Lösung inkubiert.

4. Kombiniertes Nachweis von saure-Phosphatase und POD am selben Präparat (18) :

Prinzip und Durchführung

Die Präparate werden zunächst nach der von Barka (2) angegebenen Methode und anschliessend nach der Methode von Straus (17) behandelt.

Durch diese Kombination lassen sich innerhalb der selben Zelle MPOD und saure-Phosphatase haltige große Phagolysomen, durch ihre blau-rote Mischfarbe, von MPOD haltigen großen und mittelgroßen blau gefärbten Phagosomen differenzieren.

5. Es wurden die üblichen Spezifitätskontrollen durchgeführt.

III. E R G E B N I S S E

A. GAUMENMANDEL

ERGEBNISSE

1. Intraarterielles Angebot von MPOD

a. Die in der Benzidinlösung inkubierten Präparate zeigen folgendes mikroskopisches Bild:

Im lymphoretikulären Gewebe der Gaumenmandel findet man feine blau gefärbte Zellen, die im Bereich der Basis der Gaumenmandel diffus und zum Epithel hin in einer Kette ringförmig, perifollikulär, angeordnet sind (Abb.1).

Bei stärkerer Vergrößerung kann man erkennen, daß es sich um zwei verschiedene Zellarten handelt (Abb.2).

Erstens finden sich rundliche, gut abgegrenzte und intensiv blau gefärbte Zellen. Diese Zellen finden sich in großer Anhäufung innerhalb der Gefäßlumina, sowie diffus im Gewebe verteilt. Sie haben kein charakteristisches Verteilungsmuster. Sie scheinen in unregelmäßigen Abständen, im Bereich der Kapsel vermehrt und im Zentrum der Gaumenmandel perifollikulär verteilt. Es handelt sich bei diesen Zellen um Granulozyten, deren POD die Benzidinreaktion katalysiert.

Zweitens finden sich längliche retikuläre Zellen, die blauen Farbstoff in feinverteilter Form enthalten. Die Zellform kann man auf Grund der Verteilung dieses Farbstoffes, sowie auf Grund des Negativbildes der sie umgebenden ungefärbten polygonalen oder rundlichen Zellen, die keine Farbstoffgranula enthalten, erkennen (Abb.2,4). Diese Zellen sind unregelmäßig

geformt, abgeflacht und meist mehrzipflig. Der Zellkern ist kleiner und dichter strukturiert als der der Fibrozyten.

Das vergleichende histologische Bild zeigt im Bereich dieser Gewebsbezirke verschiedene Formen von Makrophagen umgeben von Lymphozyten.

Die Betrachtung einzelner Zellen mittels Ölimmersion (Abb. 4, 7) zeigt eine granuläre, leopardenfellartige Färbung, die über den ganzen Zelleib verteilt ist.

Innerhalb der meist größeren und mehrzipfligen Zellen finden sich kleine und um den Faktor 4 größere rundliche oder ovaläre scharf gegen die Umgebung abgegrenzte Granula. Ausserdem finden sich Zellen, die meist nur kleine aber gleichgroße Granula aufweisen.

Drittens treten selten blaue Granula auch in Blutgefäßendothelien auf.

Diese Zellen sind im Gaumenmandelgewebe wie folgt angeordnet:

1. Im lymphoretikulären Gewebe der Basis der Gaumenmandel
2. Diffus zwischen ringförmigen Strukturen ("Zwickelzonen")
3. Ringförmig in einer zum Epithel parallelen Kette mit Betonung des basisnahen Anteiles des Ringes (perifollikuläre Anordnung)
4. Selten intrafollikulär.

b. Inkubation in der Lösung nach Barka :

Das Übersichtsbild zeigt eine diffuse Verteilung saure-Phosphatase - positiver Zellen im Gaumenmandelgewebe. Der rote Farbstoff ist in den meisten dieser Zellen diffus verteilt, in einigen Zellen als feine rote Granula scharf begrenzt.

Die Differenzierung des Gewebes in follikuläre und perifollikuläre

Anteile ist nicht möglich. Auch kann eine eindeutige zytologische Differenzierung nach saure-Phosphatase Nachweis nicht vorgenommen werden.

c. Kombination der Methoden von Barka und Straus :

Die Verteilung der Zellen, die blaue Granula tragen, entsprechen der der isolierten Benzidinreaktion.

Auf Grund des nun erkennbaren Gewebsaufbaues ist auch eine Zuordnung der Zellen möglich, die saure-Phosphatase, nachgewiesen als rotes Reaktionsprodukt, enthalten.

Zellen, die saure-Phosphatase-positiv sind, finden sich hier über den ganzen Schnitt verteilt, doch ist eine perifollikuläre und intrafollikuläre Anordnung deutlich.

Das rote Reaktionsprodukt findet sich in den Zellen neben blauen Granulis.

In einigen Zellen ist das Blau der Granula durch Rot zu einem violetten Farbton gemischt. Aber auch in solchen Zellen kommen isoliert rote Partien und blaue Granula vor. Die violett gefärbten Elemente sind meist besonders groß (Abb. 3, 4).

2. Intravenöses Angebot von MPOD

a. Inkubation in Benzidinlösung :

Das Übersichtsbild zeigt eine netzförmige Struktur von Blutgefäßen, die im Bereich der Basis in relativ gleichmäßiger Verteilung im übrigen Gewebe in ringförmiger Anordnung gefunden werden (Abb. 1).

Die stärkere Vergrößerung zeigt, daß an der Phagozytose hier bevorzugt Blutgefäßendothelien beteiligt sind (Abb. 2).

Es entsteht auf diese Weise ein grobes Bild der venösen Gefäßverteilung in der Gaumenmandel (9) : Aufteilung im lymphoretikulären Gewebe der Basis der Gaumenmandel und den "Zwickelzonen", sowie dichte perifollikuläre Anordnung.

Intrafollikulär finden sich wenige Gefäßlumina und damit auch wenige phagozytierende Zellen.

Neben den Blutgefäßendothelien tragen im perivaskulären Bereich verschieden geformte Makrophagen blaue Granula. Die Anzahl der phagozytierenden Zellen, die nicht in Beziehung zu Blutgefäßen stehen, ist gering.

Diese Zellen zeigen meist ovaläre oder mehrzipflige Gestalt. Die Form der Blutgefäßendothelien ist entsprechend der verschiedenen Schnittrichtung ovalär, trapezoid oder plattenförmig. Die Granula sind auch in den Blutgefäßendothelien verschieden groß; die größten sind etwa um den Faktor 4-5 größer als die feinsten. Sie sind meist regelmäßig über den gesamten Zelleib verteilt und scharf begrenzt. Die Farbintensität der Granula unterscheidet sich nicht von der bei intraarteriellem Angebot gefundenen.

Zwischen den Blutgefäßendothelien im perifollikulären Bereich, denen in den "Zwickelzonen" und denen im lymphoretikulären Gewebe der Basis der Gaumenmandel, besteht bezüglich der blauen Granula kein Unterschied. Die Zellen, die nicht in direkter Beziehung zu Blutgefäßen stehen, sind ovalär oder langgestreckt und mehrzipflig.

Diese Zellenformen entsprechen völlig denen bei intraarteriellem Angebot gefundenen. Die Granula sind unterschiedlich groß, scharf begrenzt und unregelmäßig über den Zelleib verteilt.

Auch nach intravenöser Applikation finden sich Granulozyten, die sich deutlich von den phagozytierenden Zellen unterscheiden lassen.

b. Inkubation in der Lösung nach Barka :

Die Blutgefäßendothelien sind saure-Phosphatase positiv.

Diese Zellen zeigen teilweise diffus blaßrote, teilweise intensiv rote scharf begrenzte Granula.

Bezüglich der Anzahl besteht kein Unterschied zu den Versuchen mit intraarteriellem Angebot der MPOD.

Eine eindeutige zytologische Differenzierung ist bei saure-Phosphatase Nachweis nicht möglich.

c. Kombination der Methoden von Barka und Straus :

Die Verteilung der Zellen, die blaue Granula tragen, entsprechen der isolierten Benzidinreaktion.

Die Bevorzugung der Blutgefäßendothelien im lymphoretikulären Gewebe, in den "Zwickelzonen" und perifollikulär ist deutlich.

In einigen Zellen finden sich neben den roten und blauen Granula Partikel, die einen blauroten Farbton aufweisen. Man findet solche violetten Granula sowohl in Endothelien als auch in den oben beschriebenen Makrophagen (Abb. 6).

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Zellen, die exogene Peroxydase (MPOD) in Phagosomen und Phagolysosomen enthalten, lassen sich auf Grund der Zellformen und der Verteilung der Granula eindeutig von den Granulozyten, die endogene Peroxydase enthalten, unterscheiden. Die Kontrollschnitte zeigen Peroxydase-Aktivität nur in Zellen, die eindeutig als Granulozyten zu differenzieren sind.

Die Lokalisation der exogenen Peroxydase stimmt qualitativ mit den Befunden von Naumann (10, 11, 12) überein.

Bei diesen Untersuchungen wurden Fluorochrome (z.B. Atebrin, Primulin-O, Terramycin) zur Darstellung von phagozytierenden Zellen in der Gaumenmandel verwendet (11).

Naumann fand nach intraarterieller Zufuhr dieser Substanzen zwei Typen von speichernden Zellen, die beide Fluorochrom gespeichert hatten.

Speichernde Zellen des lymphoretikulären Gewebes (perifollikulär, retikuläres Epithel, "Zwickelzonen") enthielten nach sehr kurzer Zeit, nach 1 Stunde und weniger, Fluorochrom.

Der andere Komplex von speichernden Zellen in den "hellen Zentren" der Sekundärknötchen wies erst 6 Stunden nach der Injektion Fluorochrom auf (11,12).

Die histochemische Lokalisation der exogenen Peroxydase entspricht den zuerst von Naumann beschriebenen fluorochromhaltigen Zellen.

In den "hellen Zentren" war in diesen Versuchen dagegen 3 Stunden nach der Injektion der MPOD wenig exogene Peroxydase nachzuweisen.

Diese Diskrepanz kann sowohl auf dem Zeitfaktor beruhen, als auch von den physikalischen-, chemischen Eigenschaften der beiden sehr unterschiedlichen Substanzen abhängen.

Das Antigen wurde bei intraarterieller und intravenöser Applikation in den gleichen Gewebsbezirken nachgewiesen:

1. Im lymphoretikulären Gewebe der Basis der Gaumenmandel
2. In den Zonen zwischen den Grenzen zweier Follikel
3. Im perifollikulären Gewebe
4. Auffallend selten intrafollikulär.

Bei der intraarteriellen Applikation wurde das Antigen intrazellulär vor allem in verschieden geformten Makrophagen und nur selten in Blutgefäßendothelien gespeichert. Bei intravenösem Angebot

wurde es vermehrt in Endothelien und weniger in Retikulumzellen und Makrophagen gefunden. Ein Erscheinen von exogener Peroxydase im extrazellulären Raum konnte nicht beobachtet werden.

Im lichtmikroskopischen Bild erkennt man, daß MPOD haltige Phagosomen bis in die Enden der Fortsätze der Retikulumzellen vorhanden sind. Es läßt sich nicht ausschließen, aber es läßt sich auch nicht entscheiden, ob hier die MPOD innerhalb oder vielleicht an der äußeren Dendritenmembran lokalisiert ist. Diese Frage kann wahrscheinlich nur durch elektronenoptische Untersuchungen geklärt werden.

Durch den kombinierten Nachweis der exogenen Peroxydase und der sauren-Phosphatase lassen sich, wie Straus in Lunge, Prostata, Thymus und Milz beschrieben hat (19, 20), auch in der Gaumenmandel MPOD haltige Phagosomen und saure-Phosphatase und MPOD haltige Phagolysosomen nachweisen.

B. HALSLYMPHKNOTEN

ERGEBNISSE

1. Intraarterielles Angebot von MPOD

a. Die in der Benzidinlösung inkubierten Präparate zeigen folgendes Bild:

Die Orientierung im ungefärbten Lymphknotenpräparat ist schwieriger als in dem der Gaumenmandel.

Anzahl und Art der netzförmig angeordneten Lymphknotenzellen entspricht der der Gaumenmandel.

Die Granulozyten erscheinen relativ vermehrt.

Die MPOD-phagozytierenden Zellen finden sich vor allem im

perifollikulären Gewebe.

Wie auch in der Gaumenmandel finden sich hier intrafollikulär wenig MPOD haltige Granula (Abb. 5).

b. Inkubation in der Lösung nach Barka :

Das Übersichtsbild zeigt eine diffuse Verteilung saure-Phosphatase-positiver Zellen. Die roten Granula sind in den meisten dieser Zellen unscharf begrenzt.

Eine zytologische Differenzierung durch diese Nachweismethode ist nicht möglich.

c. Kombination der Methoden von Barka und Straus :

Die phagozytierenden Zellen sind netz- und ringförmig angeordnet.

In einigen Zellen finden sich neben blauen Granula und lachsroten Bezirken blaurote Granula.

2. Intravenöses Angebot von MPOD

a. Behandlung der Präparate nach der Methode von Straus :

Die Ergebnisse entsprechen denen des intraarteriellen Angebotes. Es sind keine Farbintensitätsunterschiede zu diesen Versuchen erkennbar.

b. Methode nach Barka und

c. Kombination der Methoden von Straus und Barka :

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen entsprechen ebenfalls denen bei intraarteriellem Angebot.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Aufnahme und Lokalisation von MPOD ist bisher in Leber, Niere, Dünndarm, Lunge, Prostata, Thymus und Milz untersucht worden (17, 20).

Nach intraarterieller und intravenöser Applikation des Antigens ist dieses im Lymphknoten mit der Gaumenmandel in vergleichbarer Menge vorzufinden.

Der Hauptanteil der exogenen Peroxydase findet sich im lymphoretikulären Gewebe besonders perifollikulär, vereinzelt auch intrafollikulär.

Die an der Phagozytose beteiligten Zellen sind bei intraarterieller Gabe vor allem retikuläre Zellen und Makrophagen, weniger endotheliale Zellen.

Dagegen überwiegen bei intravenöser Gabe die endothelialen Zellen und es finden sich zu diesem Zeitpunkt (4) (3 Stunden nach der Injektion) relativ weniger MPOD haltige Phagosomen und saure-Phosphatase und MPOD haltige Phagolysosomen in verschieden geformten Makrophagen.

Im Prinzip entspricht dieses Bild durchaus dem der Gaumenmandel (s. III, A).

Es finden sich zahlreiche MPOD-aktive Phagosomen; die Anzahl dieser Phagosomen und der sauren-Phosphatase haltigen Phagolysosomen entspricht der in der Gaumenmandel gefundenen.

In den Blutgefäßendothelien und Makrophagen ist MPOD intrazellulär in Phagosomen beziehungsweise Phagolysosomen lokalisiert, während es bei den Retikulumzellen lichtoptisch nicht sicher zu entscheiden ist, ob MPOD nicht auch an der Membran der äußersten Fortsätze dieser Zellen angelagert ist.

ERGEBNISSE

1. Intraarterielles Angebot von MPOD

a. Die in der Benzidinlösung inkubierten Präparate zeigen folgendes mikroskopisches Bild:

Neben dem Reichtum der Milz an Granulozyten wird das Bild durch sehr viele phagozytierende Zellen charakterisiert. Es ist jedoch schwierig diese phagozytierenden Zellen nach dem "Peroxydasebild" bestimmten Anteilen der Milz zuzuordnen (Abb. 7).

Das Verteilungsmuster der blauen Granula enthaltenden Zellen erlaubt also weniger Rückschluß auf den Gewebsaufbau des Organs als bei der Gaumenmandel.

Die einzelnen Zellen erscheinen größer als in Gaumenmandel und Lymphknoten, sind mehrzipflig oder lanzenförmig, aber gelegentlich auch ovalär.

Innerhalb einer Zelle finden sich zarte und um den Faktor 4-5 größere blaue Granula. Diese sind über den gesamten Zelleib verteilt und finden sich noch in den feinsten erkennbaren Enden der Zellen.

b. Inkubation in der Lösung nach Barka :

Im Bereich der untersuchten Gewebspartien findet sich das lachsrote Reaktionsprodukt, das sich als weniger scharf begrenzte, teilweise konfluierende Granula im Zelleib darstellt, gleichmäßig verteilt.

Rückschlüsse auf den Gewebsaufbau sind auch hier aus dem Auftreten des Reaktionsproduktes der sauren-Phosphatase nicht

möglich (Abb. 9).

c. Kombination der Methoden von Barka und Straus :

Einzelne Zellen zeigen neben den deutlich blauen Granula und lachsroten Granula auch blaurot bis violett gefärbte Granula, die den von Straus nachgewiesenen Elementen (Phagolysosomen) entsprechen.

Eine bevorzugte Lokalisation solcher Elemente war nicht festzustellen; die Häufigkeit des Vorkommens war, verglichen mit Gaumenmandel und Lymphknoten, bei der Milz wesentlich größer (Abb. 8).

2. Intravenöses Angebot von MPOD

a, b, c. Die Ergebnisse aller Untersuchungen entsprechen denen bei intraartiellem Angebot.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Straus fand (18, 19) nach intravenöser Gabe von MPOD 20-40 min nach Verabreichung in der Milz von Ratten exogene Peroxydase im lymphatischen Grundgewebe und perifollikulär.

Die MPOD tritt in den Phagolysosomen der Phagozyten und in den Phagosomen der endothelialen Zellen auf (21).

Die Milz der Kaninchen zeigt nach intraarterieller und intravenöser Applikation von MPOD das gleiche Bild wie Straus es bei der Rattenmilz beschrieben hat.

Im Gegensatz zur Gaumenmandel konnte hier, wie auch beim Hals -

lymphknoten,kein Unterschied zwischen intraarterieller und intravenöser Applikation festgestellt werden.

Im Vergleich zu Gaumenmandel und Halslymphknoten ist in der Milz wesentlich mehr exogene Peroxydase intrazellulär in Phagosomen und Phagolysosomen gespeichert.

Hier ist auch die Anzahl der saure-Phosphatase und MPOD haltigen Phagolysosomen gegenüber der MPOD haltigen Phagosomen erhöht.

Extrazellulär ist auch hier keine MPOD nachzuweisen.

Wie auch bei Gaumenmandel und Lymphknoten ist bei den Fortsätzen der retikulären Milzzellen nicht sicher zu entscheiden, ob die exogene Peroxydase noch innerhalb oder an der Membran der Fortsätze angelagert ist.

Bei den Kontrolluntersuchungen ist lediglich endogene Peroxydase in Granulozyten nachweisbar.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Das für Kaninchen (7, 23) und für Hühner (5, 16) immunogene Enzymprotein Meerrettich-Peroxydase(MPOD) ist gut geeignet, das Schicksal eines Antigens im Organismus zu verfolgen.

MPOD läßt sich in den untersuchten Organen : Gaumenmandel, Halslymphknoten und Milz von Kaninchen 3 Stunden nach intraarterieller oder intravenöser Applikation enzymhistochemisch nachweisen und lokalisieren.

In der Milz ist wesentlich mehr MPOD nachzuweisen als in der Gaumenmandel und Lymphknoten; Gaumenmandel und Halslymphknoten enthalten hingegen MPOD in vergleichbarer Menge.

Trotz des morphologisch verschiedenen Aufbaus der untersuchten Organe, findet sich MPOD in den drei Organen in Endothelien, Makrophagen und Retikulumzellen im lymphoretikulären Gewebe, vorwiegend perifollikulär, selten intrafollikulär.

Innerhalb der Zellen ist MPOD in Phagosomen und Phagolysosomen anzutreffen.

In der Milz sind MPOD haltige Phagolysosomen häufiger als in der Gaumenmandel und dem Halslymphknoten.

Die gewählte Applikationsart beeinflußt die Lokalisation des Antigens in der Milz nicht.

Bei Gaumenmandel und Lymphknoten dagegen findet man eine gewisse Abhängigkeit von der Applikationsform. Es zeigen sich keine qualitativen aber deutliche quantitative Unterschiede.

Nach intraarterieller Gabe fand sich die exogene Peroxydase in Phagosomen und Phagolysosomen von Makrophagen und wenigen Endothelien, während MPOD nach intravenöser Gabe vor allem in Endothelien und weniger in Makrophagen auftrat.

Wichtig für die Klärung der zellulären Basis des Mechanismus der Antikörperbildung ist die Frage, ob das Antigen oder ein Bruchstück des Antigens, das noch eine oder mehrere determinierende Gruppen enthält, direkt mit hypothetischen Rezeptoren von "lymphoiden", für die Antikörperbildung verantwortlichen Zellen, in Kontakt treten kann oder nicht.

Die elektronenmikroskopischen autoradiographischen Untersuchungen von Mitchell und Abbot (8) sprechen für die Möglichkeit dieses direkten Kontaktes.

Aus den in der Einleitung bereits aufgeführten Gründen ist die bei diesen Untersuchungen angewendete Methode nicht beweiskräftig. Es ließ sich zwar nicht ausschließen, aber auch nicht eindeutig entscheiden, ob "lymphoide" Zellen mit MPOD in direktem Kontakt stehen.

Neben Makrophagen und Endothelien, die MPOD, in Phagosomen und Phagolysosomen, sicher intrazellulär enthielten, ist bei den im lymphoretikulären Gewebe, in den "Zwickelzonen" und perifollikulär liegenden mehrzipfligen Retikulumzellen, die von Lymphozyten umgeben sind, nicht sicher zu entscheiden, ob die MPOD nur innerhalb oder an der äußeren Dendritenmembran lokalisiert ist.

Diese Untersuchungen dienten als Vorarbeit für anschließende elektronenmikroskopische Untersuchungen, die möglicherweise diese Frage entscheiden können.

- 1) Bargmann W. : Die mesodermalen Zellelemente
des lockeren Bindegewebes.
Histologie und mikroskopische
Anatomie des Menschen S. 113
G. Thieme Verlag, Stuttgart
(1959)
- 2) Barka T. and Anderson P. J. : Histochemical methode for
acid phosphatase using hex-
onium pararosanilin as coupler.
J. Histochem. Cytochem.
10, 741 (1962)
- 3) Bloom W. and Fawcett D. W. : Makrophages (Histiocytes) in
Textbook of histology p. 144
W. B. Saunders Company
Philadelphia, Toronto
(1962, reprinted 1968)
- 4) Diamantstein T. : MPOD-Clearance Untersuchungen
bei Kaninchen.
persönliche Mitteilung
- 5) Diamantstein T. : Nachweis von Antikörpern
gegen MPOD im Serum von
Hühnern.
persönliche Mitteilung
- 6) Fioretti A. : Die Gaumenmandel.
Darstellung der Biologie und
Physiopathologie.
Padua 1957
Thieme Verlag Stuttgart (1961)
S. 42-49
- 7) Leduc E. H. , Avrameas S.
and Bouteille M. : Ultrastructural study of anti-
body production in differen-
tiating plasma cells of rabbit
spleen.
J. Cell. Biol. 35, 79A (1967)
- 8) Mitchell J. and Abbot A. : Ultrastructure of the antigen
retaining reticulum of lymphnode
follicles as shown by high-
resolution autoradiography.
Nature 208, 500 (1965)

- 9) Naumann H. H. : Das Blutgefäßsystem in der Gaumenmandel.
Zeitschr. für Laryng. Rhin. Otol. 33, 359 (1955)
- 10) Naumann H. H. : Eigenfluoreszenz der Gaumenmandel.
Zeitschr. für Laryng. Rhino. Otol. 34, 431 (1955)
- 11) Naumann H. H. : Schicksal der auf dem Blutwege zugeführten Stoffe in der Gaumenmandel.
Zeitschr. für Laryng. Rhino Otol. 35, 28 (1956)
- 12) Naumann H. H. : Das retikuloendotheliale System der Gaumenmandel.
Zeitschr. für Laryng, Rhin. Otol. 36, 195 (1956)
- 13) Nossal G. J. V. : Immunbiological tolerance a new model system for low zone induction.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 129, 822 (1966)
- 14) Nossal G. J. V. , Ada G. L. and Austin C. M. : Zitiert in :
Advances in immunology. Vol. 8 edited by Dixon F. J. and Kunkel H. H.
Academic press, New York and London (1968) S. 96
- 15) Rappoport S. M. : Peroxydase und Katalase
Phys. chem. Praktikum VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin (1965) S. 170
- 16) Schlüns J. : Nachweis antikörperbildender Zellen in der Milz von mit MPOD immunisierten Hühnern.
persönliche Mitteilung
- 17) Straus W. : Cytochemical investigation of phagosomes and related structures in cryostat sections of the kidney and liver of rats after intravenous administration of horseradish peroxydase.
Ex. Cell. Res. 27, 80 (1962)

- 18) Straus W. : Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected peroxylase. *J. Cell. Biol.* 20, 497 (1964)
- 19) Straus W. : Occurrence of phagosomes and phagolysosomes in different segments of nephron in relation to the reabsorption, transport, extrusion of intravenously injected horseradish peroxylase. *J. Cell. Biol.* 21, 295 (1964)
- 20) Straus W. : Factors affecting the cytochemical reaction of peroxylase with benzidine and the stability of the blue reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 462 (1964)
- 21) Straus W. : Factors affecting the state of injected horseradish peroxylase in animal tissues and procedures for the study of phagosomes and phagolysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 470 (1964)
- 22) Straus W. : Methods for the study of small phagosomes and their relationship to lysosomes with horseradish peroxylase as a "marker-protein" *J. Histochem. Cytochem.* 15, 375 (1966)
- 23) Straus W. : Cytochemical detection of sites of antibody to horseradish peroxylase in spleen and lymph nodes. *J. Histochem. Cytochem.* 16, 237 (1968)
- 24) Theorell H. : Molecular weight of horseradish peroxylase. *Ark. Kemi. Min. Geol.* 15B No 24, 1 (1942)

VI. BILDTEIL

Abb. 1 : Peroxydase-nach-
weis in der Gaumen-
mandel (Vergr. :250 fach)

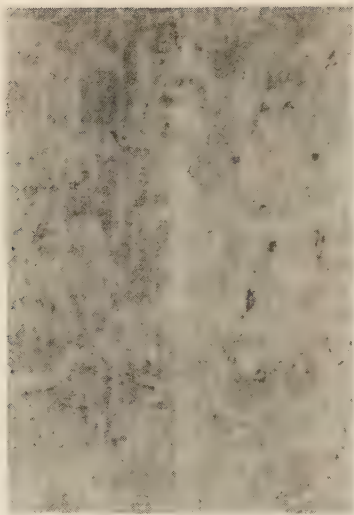


Abb. 2 : Peroxydase-nach-
weis in der Gaumen-
mandel (Vergr. :650 fach)



Abb. 3 : Kombiniertes Nach-
weis von Peroxydase und
saure Phosphatase in der
Gaumenmandel (Vergr. :650 fach)



Abb. 4 : Kombiniertes Nach-
weis von Peroxydase und
saure Phosphatase in der
Gaumenmandel (Vergr. :1000 fach)

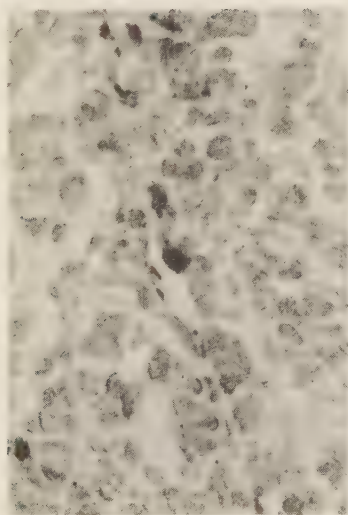


Abb. 5 : Peroxydasenachweis
im Lymphknoten
(Vergr. : 250 fach)

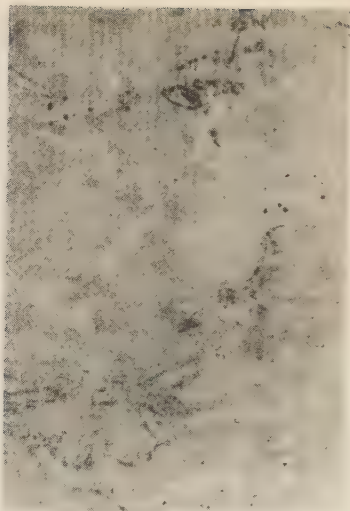


Abb. 6 : Kombiniertes Nach-
weis von Peroxydase und saure
Phosphatase im Lymphknoten
(Vergr. : 1000 fach)

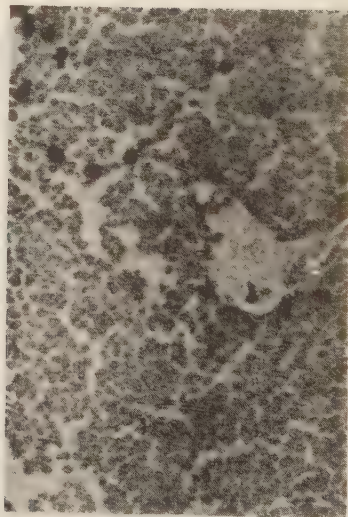


Abb. 7 : Peroxydase-
nachweis in der Milz
(Vergr. : 1000 fach)

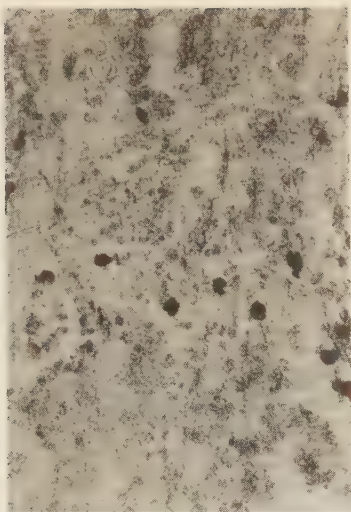


Abb. 8 : Kombiniertes Nach-
weis von Peroxydase und
saure-Phosphatase in der Milz
(Vergr. : 1000 fach)

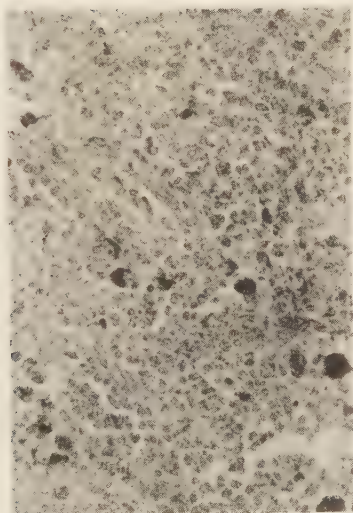
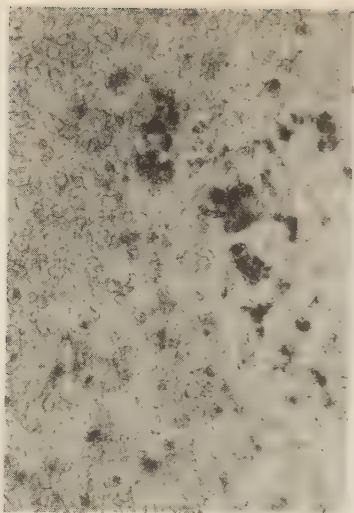


Abb. 9 : Nachweis der sauren
Phosphatase in der Milz
(Vergr. : 1000 fach)



Herrn Professor Dr. med. H. H. Naumann danke ich für
die Überlassung des Themas.

Die vorliegende Dissertation wurde unter Leitung
von Herrn Privatdozent Dr. Tibor Diamantstein
angefertigt.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 5. Juni 1939 als Sohn des Architekten Wilhelm Eberhard Sauer und seiner Ehefrau Marie Dorothee, geborene Leib, in Mainz geboren.

Im Frühjahr 1959 legte ich die Reifeprüfung an der Georg-Büchner Schule in Darmstadt ab.

Mein Medizinstudium begann ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main; dort bestand ich im Frühjahr 1960 die naturwissenschaftliche, im Herbst 1962 die ärztliche Vorprüfung. Während der ersten drei klinischen Semester war ich an der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen immatrikuliert. Ich beendete mein Studium in Frankfurt am Main, wo ich im Frühjahr 1966 die ärztliche Prüfung ablegte.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an Berliner Kliniken ab; außer meiner Tätigkeit in den Pflichtdisziplinen war ich in einer Kinderklinik, einer Augenklinik und einer Klinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten tätig.

Die Bestellung als Arzt wurde mir am 30. November 1968 vom Hessischen Minister für Arbeit, Volkswohlfahrt und Gesundheitswesen erteilt.

Seit dem 1. Dezember 1968 bin ich als Assistent der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin, Direktor Herr Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann, tätig.

Unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Tibor Diamantstein arbeite ich in dieser Klinik auf dem Gebiet der Immunbiologie.

